

研究成果（小テーマにつき2ページ以内でまとめてください）

サブテーマ名：ナノテク材料による医療用イメージングとターゲティング技術の開発 小テーマ名：2-1-② 腫瘍特異的プローブの融合材料の開発
サブテマリーダー（所属、役職、氏名） 平岡眞寛（共同研究員・京都大学）、中條善樹（雇用研究員・京都大学） 研究従事者（所属、役職、氏名） 小松広和（雇用研究員・ASTEM）、西本清一、田邊一仁、伊藤健雄（共同研究員・京都大学） [張 周恩（雇用研究員・ASTEM）、平田 直（共同研究員・京都大学）]
研究の概要、新規性及び目標 ① 研究の概要 近年、早期かつ高精度ながん診断実現のために、「がんの形」ではなく、「がん細胞や組織で発生する病態情報」を検出する新しい可視化診断手法の開発が切望されてきた。我々は、がん組織を特徴づける因子として、「血管新生」「低酸素環境」「酸性環境」という三つの環境因子に着目した。これら因子は、がんに特徴的に発生する一方、正常組織にはほとんど見られないことから、これら情報を選択的に可視化できるプローブは、がんを明瞭に検出し得ると考えた。これら因子に応答する部位とシグナルを発信する部位から成るプローブを開発し、病態情報を正確に検出するイメージング技術の開発を試みた。 ② 研究の独自性・新規性 既存のがん診断法の多くは、形態的な情報を元にがんを検出する。したがって、正常な組織形態を知らなければ、がんと判定できず、がん診断には高度な技術と知識が必要である。また、小さながんはみつけにくい。こうした課題を解決するためには、がんの形や形態をもとに診断するのではなく、がんの特徴的に発生する病的情報を可視化し、診断する必要がある。このためには、正常組織ではシグナルを発信しない一方で、がんの病的環境を検知し、患部でのみシグナルを発信するプローブが必須である。我々は、こうした課題を解決すべく、がんの特徴的に発生する病的因子を標的とし、この病的細胞でのみシグナルを発するプローブの開発を試みた。 一方、これまでも多くのがん検出用プローブが開発されてきた。しかしながら、従来型のプローブの多くは、がんに集積するように分子設計されているものの、シグナルのオン・オフ機能が無く、常にシグナルを発信する。このため、がん部位でのシグナルに加えて、がんに集積しなかったプローブに由来するバックグラウンドシグナルも観測される。現実には、がんへのプローブの集積はわずかで、結果的にがん以外でもかなりのシグナルが観測され、がんを検出するのは極めて難しい。こうした問題を回避するため、本研究テーマでは、通常はシグナルを発信しない一方で、がん特異的な病的環境にプローブがさらされた場合のみシグナルを発信するように設計した。 さらに、研究で開発するプローブは、低分子であることが特色の一つに挙げられる。すなわち、大量供給が容易であること、また薬物動態を制御しやすいことが、本研究で開発したプローブ群のメリットである。 ③ 研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） ・ フェーズⅠ：従来までの研究過程で見出した腫瘍特異的因子応答性置換基に蛍光分子等のレポーター分子を導入し、イメージングプローブのライブラリを作成する。さらに、作成した化合物群について、それぞれ化学的手法による機能評価を行ない、効果を確認する一方、腫瘍特異的因子への応答性の向上を目指して、構造を最適化する。 ・ フェーズⅡ：フェーズⅠにおいて効果の確認できた化合物について、細胞を用いた毒性・物性を調べ、低毒性かつ安定な候補化合物を見出す。また、がん細胞・がん担持実験動物（マウス）を用いた評価系により候補化合物の絞込みを進め、各腫瘍特異的因子の検出に対応したリード化合物を創出する。さらに、本研究で開発したプローブと、本プロジェクトに参画する他研究グループで作成したナノ材料との融合研究を進め、高機能化されたがん特異的因子検出プローブを作成する。
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して） ・ フェーズⅠ：腫瘍特異的因子として、「血管新生」「低酸素」「酸性環境」の三つを選択し、それぞれ

に対応するプローブを分子設計した。試験管内に上記環境を再現したモデル実験系を組み、プローブの評価実験をすすめた。その結果、いずれのプローブも、想定どおりの機能を持つことを確認した。

- フェーズⅡ：「血管新生」「低酸素」を標的としたプローブについては、生きた細胞を用いた機能評価実験を進め、当該環境下におかれた細胞から良好なシグナルを発することを確認した。「酸性環境」を標的としたプローブについては、細胞評価系を現在構築中である。また、「低酸素」応答型プローブについては、他グループが開発を進める磁性ナノ粒子との融合を試み、低酸素環境に応答する磁性ナノ粒子の開発に成功した。

主な成果

具体的な成果内容：

- 「血管新生を標的とする蛍光プローブ」：腫瘍組織における血管新生に付随して、ほぼ普遍的に発現するアミノペプチダーゼN(CD13)に着目し、この分子マーカーと特異的に結合するオリゴペプチド(GNGRG)に蛍光性量子ドット(QD)を縮合した。合成した腫瘍イメージング用蛍光プローブ(GNGRG-QD)は、CD13受容体に特異的に結合し、CD13発現細胞でのみ強く発光した。
- 「低酸素環境を可視化する蛍光プローブ」：固形がん組織には、速い細胞増殖と腫瘍血管の形成速度の不均衡に由来して、酸素濃度の低い細胞(低酸素細胞)が発生する。この病的細胞を可視化することを目的として、低酸素応答部インドールキノロン(IQ)と発光機能部から成る低酸素応答型蛍光プローブIQ-Rhodol、IQ-Couをデザインした。これらプローブの発光機能は、IQ部の消光機能のため、通常はOFFに設定されている。一方、低酸素環境下で還元酵素によるIQ部の還元を経て活性化されると、消光機能を失う結果、本来の蛍光発光特性を回復し、発光機能はONになる。これらプローブ分子をがん細胞に投与したところ低酸素がん細胞でのみ明瞭な発光を示した。
- 「酸性環境で発光する分子プローブ」：がん低酸素領域の発生に伴い、嫌気性回路の回転と酸の産生が促進され、がん組織に酸性環境をもたらす。この酸性環境に反応して発光する蛍光プローブDOX-Dabyを開発した。このプローブは、蛍光発光部としてDOX部、消光部としてダブシル部(Daby)をもち、これら二つの機能部をイミン部を介して、結合している。プローブそのものはダブシル部の消光機能により発光しないが、酸性条件でイミン結合が加水分解を受けると、化合物が分解し、蛍光分子が放出され、発光する。実際に、各種pH条件でプローブを処理したところ、わずかな酸性条件下(pH6.5)で有意な発光が確認できた。

特許件数：3件、論文数：5件、口頭発表件数：15件

研究成果に関する評価

本研究で開発したイメージングプローブについては、これまで海外の学術論文、国内外の学会で発表し、好評を得た。特に、低酸素応答型のプローブについては、企業から共同研究の打診を受けた。

残された課題と対応方針について

細胞実験において良好な物性を示したプローブについては、動物実験を進めている。しかしながら、現在までに、想定どおりのin vivoにおける機能は確認できていない。この原因としてプローブの細胞内滞留性が低いことが考えられ、今後、構造最適化によるさらなる物性改善を進めると共に、既存のドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いた腫瘍集積性の向上を進める予定である。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合計	
	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計	16年度	17年度	18年度	19年度	20年度	21年度	小計		
人件費	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズⅠについては様式Ⅰを参照されたい			4,811	2,420	3,885	11,116	中間評価結果を受けて研究テーマの組み直しを行ったため、フェーズⅠについては様式Ⅰを参照されたい				9,431	11,733	6,798	27,962	39,078
設備費				2,349	2,000	2,804	7,153					0	0	0	0	7,153
その他研究費(消耗品費、材料費等)				8,276	7,022	1,916	17,214					0	0	450	450	17,664
旅費				251	0	500	751					0	0	0	0	751
その他				322	118	195	635					472	587	340	1,399	2,034
小計				16,009	11,560	9,300	36,869					9,903	12,320	7,588	29,811	66,680

代表的な設備名と仕様 [既存(事業開始前)の設備含む]

J S T負担による設備：3400DNAシンセサイザ
 地域負担による設備：